

Влияние облучения и наночастиц оксида марганца на гликолиз клеток глиомы человека U-87 MG

Н.Б. Илларионова¹✉, Д.В. Петровский¹, И.А. Разумов^{1, 2}, Е.Л. Завьялов^{1, 2}

¹ Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия

² Новосибирский национальный исследовательский государственный университет, Новосибирск, Россия

✉ e-mail: nina.illarionova@gmail.com

Глиомы – это наиболее распространенный тип злокачественной опухоли головного мозга. Стандартное лечение глиом заключается в хирургическом иссечении опухоли с последующей химио- и радиотерапией. Опухолевые клетки характеризуются быстрым делением с потреблением большого количества глюкозы и ее расщеплением в процессе гликолиза. Для поддержания быстрого деления уровень гликолитической активности опухолевой клетки значительно увеличен по сравнению с нормальными клетками. Известно, что некоторые наночастицы (НЧ) обладают свойством накапливаться в опухолях. В частности, НЧ оксида марганца могут проникать в мозг и при значительном накоплении вызывать токсические эффекты. Эти факты послужили предпосылкой для изучения эффектов НЧ оксида марганца на жизнеспособность клеток глиомы. Целью нашей работы было исследование эффектов НЧ оксида марганца, а также их сочетания с гамма-облучением на гликолиз клеток глиомы. Облучение клеток производили на исследовательской гамма-установке радиобиологической «ИГУР-1» на основе ¹³⁷Cs. Уровень активности клеточного гликолиза определяли с помощью стандартного метода гликолитического стресса на приборе Seahorse XFp. Жизнеспособность клеток определяли с помощью окрашивания реагентом ViaCount живых и мертвых клеток. Подсчет клеток проводился с помощью проточной цитометрии. Мы показали, что гликолиз клеток глиомы U-87 MG значительно снижался при инкубации в течение 48 ч с НЧ оксида марганца. Облучение в комплексе с НЧ или отдельно не оказывало значительных эффектов на гликолиз глиом. Нами установлено, что через 72 ч после начала инкубации с НЧ оксида марганца жизнеспособность глиом достоверно снижалась. Данное исследование может быть полезным для разработки новой терапии и диагностики глиом.

Ключевые слова: глиома; наночастицы; оксид марганца; гликолиз.

Для цитирования: Илларионова Н.Б., Петровский Д.В., Разумов И.А., Завьялов Е.Л. Влияние облучения и наночастиц оксида марганца на гликолиз клеток глиомы человека U-87 MG. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2019;23(1):81-85. DOI 10.18699/VJ19.465

Effects of radiation and manganese oxide nanoparticles on human glioblastoma cell line U-87 MG glycolysis

N.B. Illarionova¹✉, D.V. Petrovski¹, I.A. Razumov^{1, 2}, E.L. Zavyalov^{1, 2}

¹ Institute of Cytology and Genetics, SB RAS, Novosibirsk, Russia

² Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russia

✉ e-mail: nina.illarionova@gmail.com

Gliomas are the most common type of malignant brain tumors. Standard treatment of gliomas consists of surgical excision of the tumor with subsequent chemotherapy and radiotherapy. Tumor cells are characterized by rapid division with an increased uptake of glucose and its catabolism during glycolysis. To maintain rapid division, the level of glycolysis of the tumor cell is significantly increased, compared with normal cells. It is known that some nanoparticles (NP) have the property of accumulating in tumors. In particular, NPs of manganese oxide can penetrate into the brain and, with considerable accumulation, cause toxic effects. These facts served as a prerequisite for studying the effects of manganese oxide NPs on the viability of glioma cells. The purpose of this work was to study the effects of manganese oxide NPs, as well as their combination with gamma irradiation on the glycolysis of glioma cells. The cells were irradiated using the research radiobiological gamma-installation IGUR-1 based on ¹³⁷Cs. The level of cell glycolysis was determined using the standard glycolytic stress test on a Seahorse XFp platform. Cell viability was determined using the ViaCount reagent staining of living and dead cells. Their count was performed using flow cytometry. We showed that the glycolysis of U-87 MG glioma cells was significantly reduced when incubated for 48 hours with manganese oxide NPs. Irradiation in combination with NPs or alone did not have significant effects on glycolysis of gliomas. Glioma incubation with manganese

oxide NPs for 72 hours led to a significant reduction in cell viability. This study may be useful for the development of new therapies and diagnosis of gliomas.

Key words: glioma; nanoparticles; manganese oxide; glycolysis.

For citation: Illarionova N.B., Petrovski D.V., Razumov I.A., Zavyalov E.L. Effects of radiation and manganese oxide nanoparticles on human glioblastoma cell line U-87 MG glycolysis. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii* = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2019;23(1):81-85. DOI 10.18699/VJ19.465 (in Russian)

Введение

Глиомы – наиболее распространенный злокачественный тип опухолей головного мозга. Метаболизм клеток опухоли и в частности глиомы отличается от метаболизма нормальной клетки (Pavlova, Thompson, 2016). Еще в начале прошлого века Отто Г. Варбург показал, что раковые клетки в гораздо большей степени, чем нормальные клетки, производят энергию за счет гликолиза (Warburg et al., 1927). Для поддержания активного деления опухолевые клетки увеличивают захват глюкозы и глутамина и повышают уровень гликолитической активности, даже в присутствии кислорода. В соответствии с уровнем опасности для продолжительности жизни пациента выделяют четыре степени злокачественности глиом (Louis et al., 2016). Недифференцированные глиомы относят к третьему и четвертому классу злокачественности, средняя продолжительность жизни пациента после диагностики такого рода опухоли составляет 15 месяцев (Stupp et al., 2009). Линия клеток глиобластомы человека U-87 MG, которая относится к четвертому классу степени злокачественности, широко используется как модель рака головного мозга (Lenting et al., 2017). Ее метаболизм хорошо охарактеризован, в том числе в сравнении с метаболизмом астроцитов человека. В частности, установлено, что у клеток линии U-87 MG уровень гликолитической активности в три раза выше, чем у нормальных астроцитов человека (Poteet et al., 2013), а уровень активности окислительного фосфорилирования в два раза выше. Все это указывает на большие энергозатраты, которые нужны для поддержания активного деления опухолевых клеток линии U-87 MG.

Основными направлениями в терапии глиом в настоящее время являются хирургическое иссечение опухоли, химиотерапия и радиотерапия. Однако злокачественные глиомы характеризуются высокой пролиферацией и инвазивностью. Часто после проведенной терапии новый очаг опухоли возникает в стороне от прооперированной области (Claes et al., 2007). Кроме того, некоторые типы глиом становятся не респонсивны к химиотерапии (Sarkaria et al., 2008). В этой связи требуются новые подходы в терапии глиом.

Одним из активно развиваемых подходов в борьбе с опухолями является применение наночастиц (НЧ), которые имеют свойство накапливаться в опухолях (Hernandez-Pedro et al., 2013; Tzeng, Green, 2013). Проводятся исследования по созданию противоопухолевых препаратов с использованием НЧ металлов или их соединений с другими веществами или молекулами, обладающими противоопухолевой активностью (Steichen et al., 2013; Vinardell, Mitjans, 2015; Tran et al., 2017). Результаты изучения биологической активности подобных НЧ говорят о перспективности их применения в развитии методов диагностики и терапии глиом. Наночастицы захватыва-

ются клетками путем эндоцитоза и могут накапливаться во внутриклеточных везикулах (Oh, Park, 2014). Проведенный ранее анализ распределения МРТ-контраста при внутривенном введении НЧ оксида марганца показал, что НЧ накапливались главным образом в клетках глиобластомы человека U-87 MG после их ортотопической ксенотрансплантации в головной мозг иммунодефицитным мышам (Завьялов и др., 2015). В другом исследовании было показано, что НЧ оксида марганца обладали цитотоксичностью в отношении клеток U-87 MG в экспериментах *in vitro* (Razumov et al., 2017). Кроме этого, НЧ оксида марганца усиливали цитотоксические свойства гамма-облучения (Kuper et al., 2016).

В данной работе мы исследовали *in vitro* эффекты оригинальных НЧ оксида марганца (Mn_3O_4) на жизнеспособность клеток глиомы U-87 MG, а также интенсивность процессов гликолиза в этих клетках в сравнении с гликолизом в нормальных астроцитах мышей, как после воздействия исследуемых НЧ или гамма-облучения, так и при их совместном воздействии.

Материалы и методы

Получение коллоидного раствора НЧ оксида марганца Mn_3O_4 . Наночастицы оксида марганца получены в лаборатории. Смесь 10 мл 0.5 М раствора $MnCl_2$ и 15 мл 20 % раствора Полисорбата-20, а также смесь 5 мл 2 М раствора КОН и 20 мл 20 % раствора Полисорбата-20 обрабатывали ультразвуком 10 мин. Оба раствора смешивали и центрифугировали при 18000 g в течение 30 мин. Осадок трижды отмывали дистиллированной водой. Полученные НЧ хранили до начала эксперимента при температуре +4...+6 °С и перед применением обрабатывали ультразвуком (частота 20 кГц, мощность 300 Вт/л; тридцать циклов ON (30 с)/OFF (30 с)). Гидродинамический радиус полученных частиц, измеренный с помощью ZetaSizer Nano (Malvern), выявил два пика – 59 и 249 нм.

Клеточная линия глиомы человека U-87 MG была культивирована в среде DMEM 31885 с L-глутамином 1 мкМ, FBS 10 %, пенициллином и стрептомицином 50 мкг/мл (все реагенты GIBCO Laboratories). Эксперименты проводили между 4–10 пассажами клеток после размораживания. Клетки пересевались по 2500 клеток/лунку в 8-луночный мини-планшет для Seahorse XFr (Agilent) за день до начала инкубации с НЧ оксида марганца. Наночастицы оксида марганца добавляли к ростовой среде в финальной концентрации 0.07 мг/мл и инкубировали с клетками 48 ч для измерения гликолиза и 72 ч для оценки жизнеспособности клеток.

Первичные астроциты гиппокампа мыши. Диссоциированная культура гиппокампа мыши получена из эмбрионов мышей линии C57BL/6j в возрасте 17 дней эмбрионального развития. Выделенные гиппокампы эмб-

рионов инкубировали с трипсином 0.25 % (GIBCO Laboratories) в HBSS буфере (14175-053 GIBCO Laboratories) с HEPES 20 мМ (Sigma), 37 °С, 10 мин. Затем гиппокампы были омыты в HBSS буфере с HEPES. Гиппокампы измельчали до отдельных клеток с помощью пипетирования в ростовой среде. Астроциты были посеяны по 5000 клеток/лунку в 8-луночный мини-планшет для Seahorse XFp (Agilent) в среде DMEM 31885 с L-глутамином 1 мкМ, FBS 10 %, пенициллином и стрептомицином 50 мкг/мл (все реагенты GIBCO Laboratories). Клетки выращивали в течение 8 дней. Наночастицы оксида марганца добавляли к ростовой среде в финальной концентрации 0.07 мг/мл и инкубировали с клетками 48 ч для измерения гликолиза.

Облучение клеток глиомы человека производили на исследовательской гамма-установке радиобиологической «ИГУР-1» на основе ¹³⁷Cs. Продолжительность одного сеанса облучения 1 ч. Доза облучения, полученная клетками за этот период, составила 40 Гр.

Для исследования клеточного гликолиза использовали стандартный протокол гликолитического стресса (Agilent). Измерение проводили на оборудовании Seahorse XFp (Agilent). Прибор измеряет скорость протонирования среды (ECAR), которое связано с экспортом лактата, производным гликолиза, вне клетки. Перед измерениями клетки проинкубировали в среде без глюкозы (1 ч). После начала измерения добавили 10 мМ глюкозы для индукции активного гликолиза. Максимальный уровень гликолитической активности достигался блокировкой окислительного фосфорилирования 1 мкМ олигомицином – ингибитором АТФ-синтазы.

Тест на жизнеспособность клеток проводили методом Guava ViaCount, различающим живые и мертвые клетки (Merck). Подсчет клеток выполняли с помощью проточной цитометрии (Guava® easyCyte HT Sampling Flow Cytometer, Merck).

Статистический анализ. Полученные результаты обрабатывали с помощью двухфакторного дисперсионного анализа ANOVA. Все данные представлены как среднее ± стандартная ошибка среднего.

Результаты и обсуждение

Важным показателем жизнеспособности клеток является их метаболизм. Поскольку метаболизм опухолевой клетки во многом связан с гликолизом, мы измеряли уровень гликолитической активности в клетках глиомы с помощью метода гликолитического стресса на приборе Seahorse XFp (Agilent). Измерения гликолиза производили через 48 ч после начала инкубации клеток в ростовой среде с НЧ марганца и через 24 ч после облучения. При добавлении 10 мМ глюкозы уровень гликолитической активности клеток U-87 MG, инкубированных с НЧ оксида марганца, был достоверно ниже по сравнению с контролем (ANOVA F(1, 36) = 15.37; $p < 0.001$) (рис. 1). При последующей блокировке цепи окислительного фосфорилирования с помощью олигомицина уровень гликолитической активности контрольной группы возрос и был достоверно выше, чем уровень гликолитической активности группы, инкубированной с НЧ (ANOVA F(1, 36) = 15.04; $p < 0.001$).

Интересно, что влияние радиации на клетки глиомы U-87 MG практически не отразилось на уровне их гли-

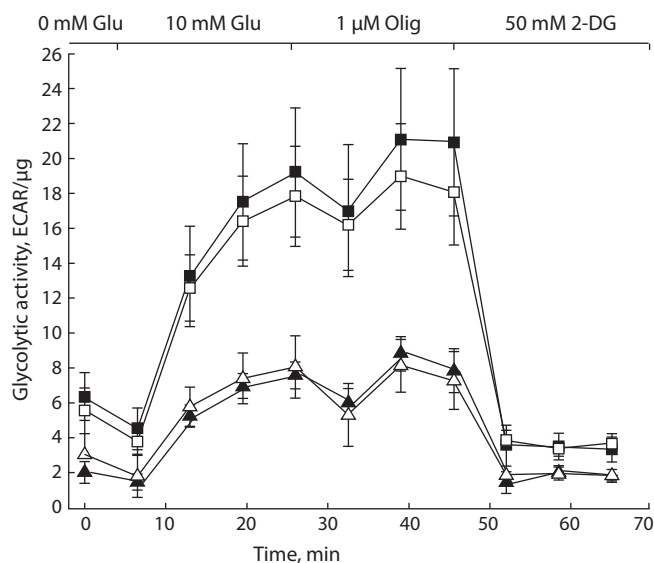


Fig. 1. Effect of manganese oxide nanoparticles and irradiation on glycolysis in human U-87 MG glioma cells.

Glyoma cells were incubated with manganese oxide nanoparticles for 48 h and irradiated (40 Gy) 24 h before the glycolysis assay. According to the glycolytic stress test protocol, cells were incubated without glucose (0 mM Glu). Then 10 mM glucose was added to induce active glycolysis, oxidative phosphorylation being arrested by 1 µM oligomycin (Olig) for additional glycolysis intensification. Glycolysis was terminated by adding 2-deoxyglucose (2-DG). Control measurements are designated by black squares, and measurements after irradiation, by open squares. Measurements after 48-h incubation with the nanoparticles are shown with black triangles, and measurements after the incubation and irradiation, with open triangles.

колитической активности за период наблюдения. По этому показателю контрольная группа достоверно не отличалась от группы клеток с облучением. Известно, что линия глиомы человека U-87 MG характеризуется значительной устойчивостью к облучению (Naidu et al., 2010). Базальный уровень гликолитической активности, при отсутствии глюкозы в среде, не различался достоверно между группами.

Отмечалось изменение жизнеспособности клеток на фоне изменения уровня гликолиза в клетках U-87 MG в ответ на добавление НЧ и облучение. Мы использовали дифференцированный метод окраски клеток ViaCount (Merck) на живые и мертвые клетки в культуре. Тест на жизнеспособность клеток проводился через 72 ч после начала инкубации с НЧ и через 48 ч после облучения. Результаты оценки жизнеспособности клеток глиомы U-87 MG показали, что через 72 ч после начала инкубации клеток с НЧ доля живых клеток сокращалась на 16 % (ANOVA F(1, 8) = 6.28, $p < 0.05$) (рис. 2). Облучение снизило также выживаемость клеток, но эти изменения были недостоверными. Примечательно, что взаимодействия факторов облучения и инкубации с НЧ не обнаружено. Полученные результаты согласуются с представлениями о радиорезистентности клеток линии U-87 MG четвертого класса злокачественности (Naidu et al., 2010).

Наночастицы в силу своей высокой проникаемости в ткани и накопления в глиомах широко исследуются как

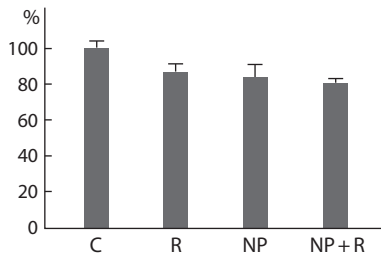


Fig. 2. The significant decrease of human glioma cell viability after incubation with manganese oxide nanoparticles (72 h).

Experimental groups of cells: control (C), irradiation (R), nanoparticles (NP), irradiation and nanoparticles (NP + R). Dead and living cells in the groups were counted with the reagent Guava ViaCount for flow cytometry. Y-axis, percentage of living cells with reference to the control.

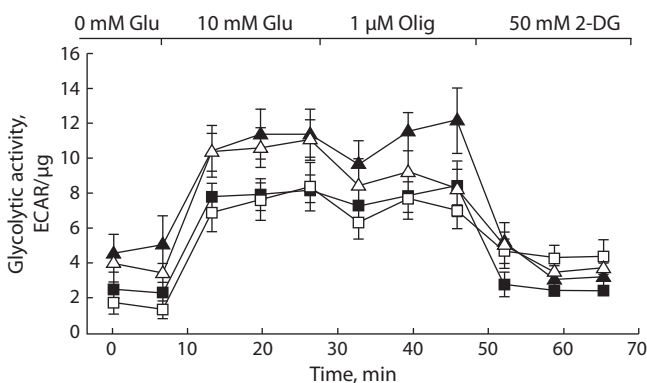


Fig. 3. Effect of manganese oxide nanoparticles and irradiation on murine astrocytes incubated with manganese oxide nanoparticles for 48 h.

Designations follow Fig. 1.

потенциальные инструменты для терапии глиом (Caruso et al., 2011). Подавление гликолиза глиом является одной из стратегий усиления цитотоксических эффектов. Мы наблюдаем значительное снижение уровня гликолиза через 48 ч инкубации с НЧ оксида марганца. Далее, через 72 ч после начала инкубации, количество живых клеток снижается на 16 %. Известно, что избыток марганца имеет цитотоксичный эффект, предположительно из-за воздействия на митохондриальное дыхание. В частности, ранее было показано снижение цитозольного уровня АТФ в клетках эндотелия после 24 ч инкубации с НЧ оксида марганца (MnO) (Landgraf et al., 2015). Вместе с тем, после инкубации в течение 48 ч с НЧ оксида марганца (Mn₃O₄) происходит значительное снижение уровня гликолиза. Таким образом, можно заключить, что НЧ оксида марганца угнетают все системы энергообеспечения клетки глиомы, делая ее уязвимой для неблагоприятного внешнего воздействия.

Для сравнения влияния НЧ оксида марганца на нормальные клетки мозга мы использовали в качестве модели первичные астроциты мыши. Уровень гликолитической активности контрольных астроцитов мыши не отличался значительно от уровня гликолитической активности астроцитов из групп, проинкубированных с НЧ и/или облученных (рис. 3), и был меньше, чем у клеток глиомы

человека U-87 MG (см. рис. 1 и 3). Полученные данные согласуются с принятыми представлениями о повышенном уровне гликолиза в клетках опухоли.

Таким образом, воздействие НЧ оксида марганца приводило к значительному снижению уровня гликолиза клеток глиомы U-87 MG на фоне снижения их жизнеспособности, тогда как накопительная доза облучения в 40 Гр не оказывала достоверного влияния на гликолиз и жизнеспособность клеток глиомы U-87 MG. Кумулятивного эффекта от воздействия облучения и НЧ также не наблюдалось. Полученные результаты могут представлять интерес в свете разработки новых схем терапии глиом, где в качестве аддитивного угнетающего компонента при комплексной химиотерапии на опухолевые клетки могут быть использованы НЧ оксида марганца.

Список литературы / References

- Zavyalov E.L., Razumov I.A., Gerlinskaya L.A., Romashchenko A.V. *In vivo* MPT-визуализация динамики развития глиобластомы U87 в модели ортотопической ксенотрансплантации мышам линии SCID. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2015; 19(4):460-465. DOI 10.18699/J15.061.
- [Zavyalov E.L., Razumov I.A., Gerlinskaya L.A., Romashchenko A.V. *In vivo* MRI visualization of growth and morphology in the orthotopic xenotransplantation U87 glioblastoma mouse SCID model. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selekcii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2015;19(4):460-465. DOI 10.18699/J15.061. (in Russian)]
- Caruso G., Caffo M., Alafaci C., Raudino G., Cafarella D., Lucerna S., Salpietro F.M., Tomasello F. Could nanoparticle systems have a role in the treatment of cerebral gliomas? *Nanomedicine*. 2011;7(6):744-752. DOI 10.1016/j.nano.2011.02.008.
- Claes A., Idema A.J., Wesseling P. Diffuse glioma growth: a guerilla war. *Acta Neuropathol*. 2007;114(5):443-458. DOI 10.1007/s00401-007-0293-7.
- Hernandez-Pedro N.Y., Rangel-Lopez E., Magana-Maldonado R., de la Cruz V.P., del Angel A.S., Pineda B., Sotelo J. Application of nanoparticles on diagnosis and therapy in gliomas. *Biomed. Res. Int*. 2013;351031:1-20. DOI 10.1155/2013/351031.
- Kuper K.E., Zavyalov E.L., Razumov I.A., Romashchenko A.V., Stupak A.S., Troicky S.Yu., Goldenberg B.G., Legkodymov A.G., Lemzyakov A.A., Moshkin M.P. Cytotoxic effects of X-ray irradiation and MnO nanoparticles on human glioblastoma (U87). *Physics Procedia*. 2016;84:252-255. DOI 10.1016/j.phpro.2016.11.043.
- Landgraf L., Muller I., Ernst P., Schafer M., Rosman C., Schick I., Kohler O., Oehring H., Breus V.V., Basche T., Sönnichsen C., Treme W., Hilger I. Comparative evaluation of the impact on endothelial cells induced by different nanoparticle structures and functionalization. *Beilstein J. Nanotechnol*. 2015;6:300-312. DOI 10.3762/bjnano.6.28.
- Lenting K., Verhaak R., Ter Laan M., Wesseling P., Leenders W. Glioma: Experimental models and reality. *Acta Neuropathol*. 2017; 133(2):263-282. DOI 10.1007/s00401-017-1671-4.
- Louis D.N., Perry A., Reifenberger G., von Deimling A., Figarella-Branger D., Cavenee W.K., Ohgaki H., Wiestler O.D., Kleihues P., Ellison D.W. The 2016 World Health Organization classification of tumors of the central nervous system: A summary. *Acta Neuropathol*. 2016;131(6):803-820. DOI 10.1007/s00401-016-1545-1.
- Naidu M.D., Mason J.M., Pica R.V., Fung H., Pena L.A. Radiation resistance in glioma cells determined by DNA damage repair activity of Ape1/Ref-1. *J. Radiat. Res*. 2010;51(4):393-404. DOI 10.1269/jrr.09077.
- Oh N., Park J.H. Endocytosis and exocytosis of nanoparticles in mammalian cells. *Int. J. Nanomedicine*. 2014;9(1):51-63. DOI 10.2147/IJN.S26592.

- Pavlova N.N., Thompson C.B. The emerging hallmarks of cancer metabolism. *Cell Metab.* 2016;23(1):27-47. DOI 10.1016/j.cmet.2015.12.006.
- Poteet E., Choudhury G.R., Winters A., Li W., Ryou M.G., Liu R., Tang L., Ghorpade A., Wen Y., Yuan F., Keir S.T., Yan H., Bigner D.D., Simpkins J.W., Yang S.H. Reversing the Warburg effect as a treatment for glioblastoma. *J. Biol. Chem.* 2013;288(13):9153-9164. DOI 10.1074/jbc.AAC118.005625.
- Razumov I.A., Zavjalov E.L., Troitskii S.Y., Romashchenko A.V., Petrovskii D.V., Kuper K.E., Moshkin M.P. Selective cytotoxicity of manganese nanoparticles against human glioblastoma cells. *Bull. Exp. Biol. Med.* 2017;163(4):561-565. DOI 10.1007/s10517-017-3849-0.
- Sarkaria J.N., Kitange G.J., James C.D., Plummer R., Calvert H., Weller M., Wick W. Mechanisms of chemoresistance to alkylating agents in malignant glioma. *Clin. Cancer Res.* 2008;14(10):2900-2908. DOI 10.1158/1078-0432.CCR-07-1719.
- Steichen S.D., Calderera-Moore M., Peppas N.A. A review of current nanoparticle and targeting moieties for the delivery of cancer therapeutics. *Eur. J. Pharm. Sci.* 2013;48(3):416-427. DOI 10.1016/j.ejps.2012.12.006.
- Stupp R., Hegi M.E., Mason W.P., van den Bent M.J., Taphoorn M.J., Janzer R.C., Ludwin S.K., Allgeier A., Fisher B., Belanger K., Hau P., Brandes A.A., Gijtenbeek J., Marosi C., Vecht C.J., Mokhtari K., Wesseling P., Villa S., Eisenhauer E., Gorlia T., Weller M., Lacombe D., Cairncross J.G., Mirimanoff R.O. Effects of radiotherapy with concomitant and adjuvant temozolomide versus radiotherapy alone on survival in glioblastoma in a randomised phase III study: 5-year analysis of the EORTC-NCIC trial. *Lancet Oncol.* 2009;10(5):459-466. DOI 10.1016/S1470-2045(09)70025-7.
- Tran S., DeGiovanni P.J., Piel B., Rai P. Cancer nanomedicine: A review of recent success in drug delivery. *Clin. Transl. Med.* 2017;6(1):44. DOI 10.1186/s40169-017-0175-0.
- Tzeng S.Y., Green J.J. Therapeutic nanomedicine for brain cancer. *Ther. Deliv.* 2013;4(6):687-704. DOI 10.4155/tde.13.38.
- Vinardell M.P., Mitjans M. Antitumor activities of metal oxide nanoparticles. *Nanomaterials (Basel)*. 2015;5(2):1004-1021. DOI 10.3390/nano5021004.
- Warburg O., Wind F., Negelein E. The metabolism of tumors in the body. *J. Gen. Physiol.* 1927;8(6):519-530.

ORCID ID

N.B. Illarionova orcid.org/0000-0002-5058-8776
I.A. Razumov orcid.org/0000-0002-6756-1457
E.L. Zavyalov orcid.org/0000-0002-9412-3874

Acknowledgements. Experiments were supported by State Budgeted Project 0324-2019-0041. Use of the equipment of the Shared Access Center for Genetic Resources of Laboratory Animals (ICG SB RAS) was supported by the Russian Ministry of Education and Science, project RFMEFI62117X0015.

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Received November 13, 2018. Revised December 15, 2018. Accepted December 17, 2018.